

16. 4. 2004

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

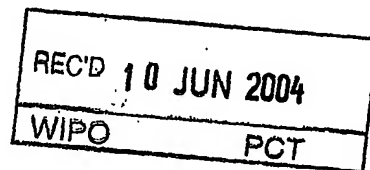
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 2003年 4月16日
Date of Application:

出願番号 特願2003-111173
Application Number:
[ST. 10/C]: [JP 2003-111173]

出願人 アークレイ株式会社
Applicant(s):

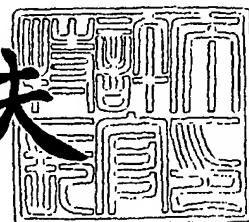


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 5月27日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願

【整理番号】 P-B0927

【提出日】 平成15年 4月16日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/09
C12Q 1/68

【発明の名称】 ミトコンドリアDNA 3 2 4 3 変異の検出法および定量
法ならびにそのためのキット

【請求項の数】 15

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市南区東九条西明田町 5 7 アークレイ株式
会社内

【氏名】 平井 光春

【特許出願人】

【識別番号】 000141897

【氏名又は名称】 アークレイ株式会社

【代理人】

【識別番号】 100100549

【弁理士】

【氏名又は名称】 川口 嘉之

【選任した代理人】

【識別番号】 100090516

【弁理士】

【氏名又は名称】 松倉 秀実

【選任した代理人】

【識別番号】 100089244

【弁理士】

【氏名又は名称】 遠山 勉

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 192372

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ミトコンドリアDNA 3243変異の検出法および定量法ならびにそのためのキット

【特許請求の範囲】

【請求項1】 試料から得られるDNAを鋳型として用いてPCRを行い、増幅産物を検出することを含む、ミトコンドリアDNA 3243変異を有するDNAの検出方法であって、PCRで用いられるプライマーは、配列番号1に示す塩基配列の塩基番号243から始まる12～30塩基長の塩基配列に相補的な塩基配列を有するプライマーを含む検出方法。

【請求項2】 PCRで用いられるプライマーが、配列番号3に示す塩基配列を有するプライマーおよび配列番号5に示す塩基配列を示すプライマーを含む請求項1に記載の方法。

【請求項3】 試料から得られるDNAを鋳型として用いて定量的PCRを行い、増幅産物を定量することを含む、ミトコンドリアDNA 3243変異を有するDNAの定量方法であって、定量的PCRは、増幅産物の量に依存して蛍光が変化する系を用いて、蛍光の測定によりPCRにおける増幅産物の量をリアルタイムに行い、その結果に基づいてサンプル中のDNAを定量する方法であり、定量的PCRで用いられるプライマーは、配列番号1に示す塩基配列の塩基番号243から始まる12～30塩基長の塩基配列に相補的な塩基配列を有するプライマーを含む定量方法。

【請求項4】 定量的PCRで用いられるプライマーが、配列番号3に示す塩基配列を有するプライマーおよび配列番号5に示す塩基配列を示すプライマーからなる請求項3に記載の方法。

【請求項5】 (a) 請求項3または4に記載の方法により、ミトコンドリアDNA 3243変異を有するDNAを定量し、

(b) 試料から得られるDNAを鋳型として用いて定量的PCRを行い、増幅産物を定量することを含む、ミトコンドリアDNAの定量方法であって、定量的PCRは、増幅産物の量に依存して蛍光が変化する系を用いて、蛍光の測定によりPCRにおける増幅産物の量をリアルタイムに行い、その結果に基づいてサ

ンプル中のDNAを定量する方法により、ミトコンドリアDNAを定量し、

(c) (a) と (b) の結果から、ミトコンドリアDNA3243変異のヘテロプラスミーの比率を算出する

ことを含む、試料に含まれるミトコンドリアDNA3243変異のヘテロプラスミーの比率の測定方法。

【請求項6】 (b) の工程で用いられるプライマーペアが、配列番号3に示す塩基配列を有するプライマーおよび配列番号4に示す塩基配列を示すプライマーからなる請求項5に記載の方法。

【請求項7】 系が、5' 末端が蛍光色素で標識され、ハイブリダイゼーションしたときに蛍光色素の蛍光が減少する核酸プローブであって、配列番号1に示す塩基配列において塩基番号212もしくは215から始まる15～40塩基長の塩基配列または配列番号2に示す塩基配列において塩基番号222から始まる15～40塩基長の塩基配列を有する核酸プローブを含み、前記蛍光色素の蛍光が測定される請求項3～6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】 請求項1記載の検出方法のためのキットであって、配列番号1に示す塩基配列の塩基番号243から始まる12～30塩基長の塩基配列に相補的な塩基配列を有するプライマーを含む前記キット。

【請求項9】 配列番号3に示す塩基配列を有するプライマーおよび配列番号5に示す塩基配列を示すプライマーを含む請求項8に記載のキット。

【請求項10】 請求項3記載の方法のためのキットであって、配列番号1に示す塩基配列の塩基番号243から始まる12～30塩基長の塩基配列に相補的な塩基配列を有するプライマーを含む前記キット。

【請求項11】 配列番号3に示す塩基配列を有するプライマーおよび配列番号5に示す塩基配列を示すプライマーを含む請求項10に記載のキット。

【請求項12】 請求項5記載の方法のためのキットであって、配列番号1に示す塩基配列の塩基番号243から始まる12～30塩基長の塩基配列に相補的な塩基配列を有するプライマーを含む第1のプライマーペア、および、ミトコンドリアDNA定量用の第2のプライマーペアを含む前記キット。

【請求項13】 第1のプライマーペアが、配列番号3に示す塩基配列を有す

るプライマーおよび配列番号 5 に示す塩基配列を示すプライマーからなる請求項 12 に記載のキット。

【請求項 14】 第 2 のプライマーペアが、配列番号 3 に示す塩基配列を有するプライマーおよび配列番号 4 に示す塩基配列を示すプライマーからなる請求項 12 に記載のキット。

【請求項 15】 5' 末端が蛍光色素で標識され、ハイブリダイゼーションしたときに蛍光色素の蛍光が減少する核酸プローブであって、配列番号 1 に示す塩基配列において塩基番号 212 もしくは 215 から始まる 15～40 塩基長の塩基配列または配列番号 2 に示す塩基配列において塩基番号 222 から始まる 15～40 塩基長の塩基配列を有する核酸プローブをさらに含む請求項 10～14 のいずれか一項に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ミトコンドリア DNA 3243 変異の検出法および定量法ならびにそのためのキットに関する。

【0002】

【従来の技術】

ミトコンドリア DNA 3243 部位の A→G 変異 (mt3243) は日本人糖尿病患者の 1% に存在する変異で、単一遺伝子異常による糖尿病の中で、最も高頻度である。ミトコンドリア遺伝子異常の特徴の一つは正常と異常のミトコンドリア DNA が様々な割合で共存することであり、この状態をヘテロプラスミーと呼ぶ。mt3243 変異のヘテロプラスミーの比率と病状の進行度には相関があるといわれており、病状の進行度や治療効果の測定に用いることが出来るのではないかと考えられる。

【0003】

mt3243 変異は変異が存在するとその部分に制限酵素の認識部位が出現するため、PCR で変異部分を含むように増幅を行い、制限酵素で切断し、その後電気泳動で切断されたかどうかを検出するという方法 (PCR-RFLP) で検出を行うことが出来る (例えば非特許文献 1 参照)。

【0 0 0 4】

PCRは数分子の鋳型から数10億倍もの分子を増幅するため、増幅産物がほんの少し混入した場合でも偽陽性、偽陰性の原因になり得る。PCR-RFLPはPCR反応後に増幅産物を取り出して制限酵素処理を行うという必要があるため、増幅産物が次の反応系に混入する恐れがある。よって、偽陽性、偽陰性の結果が得られてしまうことが考えられる。

【0 0 0 5】

さらに、PCR終了後、制限酵素で処理を行い、その後電気泳動を行うため、検出に必要な時間も非常に長くかかってしまう。また、操作が複雑なため自動化が困難である。さらに、PCR時に変性およびアニーリングを繰り返すため、正常型の配列と変異型の配列が間違って結合してしまう。このような産物は制限酵素によって認識されないため切断されない（二本鎖の両方が変異型の場合のみ制限酵素が切断する）。よってヘテロプラスミーの割合を定量しようとしたときに、本来の値よりも変異型の割合が低下する。

【0 0 0 6】

一方、アレルト異的増幅法として、M A S A (mutant allele specific amplification) 法と呼ばれる方法が知られている（例えば、非特許文献2 参照）。この方法では、一方のプライマーの3' 末端が変異塩基になるように設定されたプライマー対を用いてP C Rを行うことにより変異アレルト異的に増幅される。

【0 0 0 7】

また、増幅産物の量に依存して蛍光が変化する系を用いて、蛍光の測定によりP C Rにおける増幅産物の定量をリアルタイムに行い、その結果に基づいてサンプル中の核酸を定量する方法（リアルタイム定量的P C R）が知られている。この方法に従ってM A S A法を行い、M A S A法による増幅産物を定量できる。

【0 0 0 8】

【非特許文献1】

臨床病理、1 9 9 6 年、第4 4 巻、第8 号、p. 7 7 8 - 7 8 2

【非特許文献2】

関谷剛男他編、「P C R 法最前線－基礎技術から応用まで」、1 9 9 7 年、共

立出版(株)、p. 140-142

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、mt3243変異を検出および定量する方法ならびにそのためのキットを提供することを課題とする。

【0010】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、ミトコンドリアDNAにおいてmt3243変異を含む特定の領域に基づいてプライマー対を設計することにより、MASA法によりmt3243変異を検出できることを見出し、本発明を完成した。

本発明は、以下のものを提供する。

【0011】

(1) 試料から得られるDNAを鋳型として用いてPCRを行い、増幅産物を検出することを含む、ミトコンドリアDNA3243変異を有するDNAの検出方法であって、PCRで用いられるプライマーは、配列番号1に示す塩基配列の塩基番号243から始まる12~30塩基長の塩基配列に相補的な塩基配列を有するプライマーを含む検出方法。

【0012】

(2) PCRで用いられるプライマーが、配列番号3に示す塩基配列を有するプライマーおよび配列番号5に示す塩基配列を示すプライマーを含む(1)の方法。

【0013】

(3) 試料から得られるDNAを鋳型として用いて定量的PCRを行い、増幅産物を定量することを含む、ミトコンドリアDNA3243変異を有するDNAの定量方法であって、定量的PCRは、増幅産物の量に依存して蛍光が変化する系を用いて、蛍光の測定によりPCRにおける増幅産物の定量をリアルタイムに行い、その結果に基づいてサンプル中のDNAを定量する方法であり、定量的PCRで用いられるプライマーは、配列番号1に示す塩基配列の塩基番号243から始まる12~30塩基長の塩基配列に相補的な塩基配列を有するプライマーを含む定量

方法。

【0014】

(4) 定量的PCRで用いられるプライマーが、配列番号3に示す塩基配列を有するプライマーおよび配列番号5に示す塩基配列を示すプライマーからなる(3)の方法。

【0015】

(5) (a) (3) 又は (4) に記載の方法により、ミトコンドリアDNA 3243変異を有するDNAを定量し、

(b) 試料から得られるDNAを鋳型として用いて定量的PCRを行い、増幅産物を定量することを含む、ミトコンドリアDNAの定量方法であって、定量的PCRは、増幅産物の量に依存して蛍光が変化する系を用いて、蛍光の測定によりPCRにおける増幅産物の定量をリアルタイムに行い、その結果に基づいてサンプル中のDNAを定量する方法により、ミトコンドリアDNAを定量し、

(c) (a) と (b) の結果から、ミトコンドリアDNA 3243変異のヘテロプラスミーの比率を算出する

ことを含む、試料に含まれるミトコンドリアDNA 3243変異のヘテロプラスミーの比率の測定方法。

【0016】

(6) (b) の工程で用いられるプライマーが、配列番号3に示す塩基配列を有するプライマーおよび配列番号4に示す塩基配列を示すプライマーからなる(5)の方法。

【0017】

(7) 系が、5'末端が蛍光色素で標識され、ハイブリダイゼーションしたときに蛍光色素の蛍光が減少する核酸プローブであって、配列番号1に示す塩基配列において塩基番号212もしくは215から始まる15~40塩基長の塩基配列または配列番号2に示す塩基配列において塩基番号222から始まる15~40塩基長の塩基配列を有する核酸プローブを含み、前記蛍光色素の蛍光が測定される(3)~(6)のいずれかの方法。

【0018】

(8) (1)の方法のためのキットであって、配列番号1に示す塩基配列の塩基番号243から始まる12～30塩基長の塩基配列に相補的な塩基配列を有するプライマーを含む前記キット。

【0019】

(9) 配列番号3に示す塩基配列を有するプライマーおよび配列番号5に示す塩基配列を示すプライマーを含む(8)のキット。

【0020】

(10) (3)の方法のためのキットであって、配列番号1に示す塩基配列の塩基番号243から始まる12～30塩基長の塩基配列に相補的な塩基配列を有するプライマーを含む前記キット。

【0021】

(11) 配列番号3に示す塩基配列を有するプライマーおよび配列番号5に示す塩基配列を示すプライマーを含む(10)のキット。

【0022】

(12) (5)の方法のためのキットであって、配列番号1に示す塩基配列の塩基番号243から始まる12～30塩基長の塩基配列に相補的な塩基配列を有するプライマーを含む第1のプライマーペア、および、ミトコンドリアDNA定量用の第2のプライマーペアを含む前記キット。

【0023】

(13) 第1のプライマーペアが、配列番号3に示す塩基配列を有するプライマーおよび配列番号5に示す塩基配列を示すプライマーからなる(12)のキット。

【0024】

(14) 第2のプライマーペアが、配列番号3に示す塩基配列を有するプライマーおよび配列番号4に示す塩基配列を示すプライマーからなる(12)のキット。

【0025】

(15) 5'末端が蛍光色素で標識され、ハイブリダイゼーションしたときに蛍光色素の蛍光が減少する核酸プローブであって、配列番号1に示す塩基配列

において塩基番号212もしくは215から始まる15～40塩基長の塩基配列または配列番号2に示す塩基配列において塩基番号222から始まる15～40塩基長の塩基配列を有する核酸プローブをさらに含む(10)～(14)のいずれかのキット。

【0026】

【発明の実施の形態】

<1>本発明検出方法

本発明検出方法は、試料から得られるDNAを鋳型として用いてPCRを行い、増幅産物を検出することを含む、ミトコンドリアDNA3243変異を有するDNAの検出方法であって、PCRで用いられるプライマーは、配列番号1に示す塩基配列の塩基番号243から始まる12～30塩基長の塩基配列に相補的な塩基配列を有するプライマーを含むことを特徴とする。

【0027】

試料は、ミトコンドリアを含むものであれば特に限定されない。例としては、血液、口腔スワブ、組織等を挙げることができる。これらの試料から、ミトコンドリアDNAが調製される条件での通常の方法によりDNAを得ることができる。

【0028】

本発明検出方法におけるPCRは、試料から得られるDNAを鋳型とし、特定のプライマーを使用する他は、通常の、PCRの方法に従って行うことができる。

【0029】

本発明において用いられるプライマーは、配列番号1に示す塩基配列の塩基番号243から始まる12～30塩基長の塩基配列に相補的な塩基配列を有するプライマーを含む。すなわち、PCRで用いられるプライマーの一方が、配列番号1に示す塩基配列の塩基番号243から始まる12～30塩基長の塩基配列に相補的な塩基配列を有するプライマーである。

【0030】

このプライマーの3'末端はmt3243変異の部位であり、従って、このプライマーがアニールした場合のみ、DNAポリメラーゼによる伸長反応が起こるため、変

異型の配列を有するDNAが特異的に増幅される。従って、増幅産物の検出によりmt3243変異を有するDNAが検出されることになる。

【0031】

PCRに用いるプライマーは、PCRが可能な領域内に設定され、かつ、上記のように3'末端がmt3243変異の部位になるようにされたプライマーを含む他は、通常のPCRにおけるプライマーペアの設定方法と同様にして設定することができる。プライマーの長さ及びT_mは、通常には、12mer~40merで40~70℃、好ましくは16mer~30merで55~60℃である。プライマーペアの各プライマーの長さは同一でなくてもよいが、両プライマーのT_mはほぼ同一であること（通常には、相違が2℃以内）が好ましい。なお、T_m値は最近接塩基対法(Nearest Neighbor)により算出した値である。プライマーペアの例としては、配列番号3及び5に示す塩基配列を有するプライマーからなるものが挙げられる。

【0032】

上記の特定の領域におけるプライマーペアの設定は、PCRの条件を考慮して当業者に公知の方法に従って行えばよい。プライマーペアの設定は、プライマー設定用のコンピュータープログラムに基づいて行うことができる。

【0033】

PCRの条件は、通常の、PCRの方法に従って設定すればよい。本発明検出方法における代表的なPCR反応液の組成を挙げれば、以下の通りである。

【0034】

【表1】

| | |
|----------------------|--|
| DNA断片 | 10 ¹ ~10 ⁸ 分子/反応 |
| プライマー | 200~1000 nM |
| ヌクレオチド | 各20~200 μM |
| DNAポリメラーゼ | 0.01~0.03単位/μl |
| Tris-HCl(pH 8.4~9.0) | 5~20mM |
| MgCl ₂ | 1.5~3mM |
| KCl | 10~100mM |
| グリセロール | 0~20% |

(最終液量: 10~100 μ l)

【0035】

また、本発明検出方法における代表的な温度サイクルを挙げれば、以下の通りであり、この温度サイクルを通常25~40回繰り返す。

- (1) 変性、90~98℃、1~60秒
- (2) アニール、60~70℃、10~60秒
- (3) 伸長、60~75℃、10~180秒

【0036】

アニール及び伸長を一ステップで行う場合には、60~70℃、10~180秒の条件が挙げられる。

【0037】

本発明検出方法における増幅産物の検出は、通常の、増幅産物の検出方法に従って行うことができる。例えば、増幅産物をアガロースゲル電気泳動に付して検出してもよいし、増幅産物に結合して蛍光が変化する物質（例えば、二本鎖DNAに結合し、結合により蛍光強度が変化する蛍光色素等）の存在下で蛍光を測定してもよい。

【0038】

<2>本発明定量方法

本発明定量方法は、試料から得られるDNAを鋳型として用いて定量的PCRを行い、増幅産物を定量することを含む、ミトコンドリアDNA3243変異を有するDNAの定量方法であって、定量的PCRは、増幅産物の量に依存して蛍光が変化する系を用いて、蛍光の測定によりPCRにおける増幅産物の量をリアルタイムに行い、その結果に基づいてサンプル中のDNAを定量する方法であり、定量的PCRで用いられるプライマーは、配列番号1に示す塩基配列の塩基番号243から始まる12~30塩基長の塩基配列に相補的な塩基配列を有するプライマーを含むことを特徴とする。

【0039】

試料からのDNAの調製およびプライマーは、本発明検出方法に関し説明した通りである。

【0040】

増幅産物の量に依存して蛍光が変化する系を用いて、蛍光の測定によりPCRにおける増幅産物の定量をリアルタイムに行い、その結果に基づいてサンプル中のDNAを定量する定量的PCRは、公知の方法に従って行うことができる。このような方法の例としては、増幅産物にハイブリダイゼーションする、蛍光標識したプローブを用いる方法、二本鎖DNAに特異的に結合する試薬を用いる方法等が挙げられる。

【0041】

蛍光標識したプローブの例としては、5'末端に蛍光色素が、3'末端にその蛍光色素の発するエネルギーを吸収する消光物質が結合したプローブ（例えばTa qMan(商標)プローブ）、末端が蛍光色素で標識され、ハイブリダイゼーションしたときに蛍光色素の蛍光が減少する核酸プローブ（例えば、特開2002-119291号公報参照）等が挙げられる。

【0042】

以下、5'末端が蛍光色素で標識され、ハイブリダイゼーションしたときに蛍光色素の蛍光が減少する核酸プローブ（消光プローブ）を例にして、本発明において使用できるプローブについて説明する。この態様では、消光プローブが標的核酸にハイブリダイゼーションしたとき、末端部分においてプローブ-核酸ハイブリッドの複数塩基対が少なくとも一つのGとCのペアを形成するように設計する。このように設計されたプローブの例としては、配列番号1に示す塩基配列において塩基番号212もしくは215から始まる15～40塩基長の塩基配列または配列番号2に示す塩基配列において塩基番号222から始まる15～40塩基長の塩基配列を有するものが挙げられる。

【0043】

本発明における消光プローブは、上記のような塩基配列を有する他は、特開2002-119291号公報に記載された消光プローブと同様でよい。本発明の使用される消光プローブの塩基配列の例としては、配列番号6～10に示すものが挙げられる。蛍光色素としては、特開2002-119291号公報に記載されたものが使用できるが、具体例としては、FAM(商標)、TAMRA(商標)、BODIPY(

商標) FL等が挙げられる。蛍光色素のオリゴヌクレオチドへの結合方法は、通常の方法、例えば特開 2002-119291 号公報に記載の方法に従って行うことができる。

【0044】

本発明定量方法は、特定のプライマーペアを用いてミトコンドリアDNAのmt 3243変異を含む領域を増幅することの他は、蛍光色素の蛍光を測定することによるリアルタイムPCR法に従って行うことができる。本発明定量方法においては、上記プローブの存在下で増幅を行うが、用いるプローブに応じて、増幅の反応条件等を調整することは当業者であれば容易である。

【0045】

本発明定量方法における代表的なPCR反応液の組成を挙げれば、以下の通りである。

【0046】

【表2】

| | |
|-----------------------|------------------------|
| DNA断片 | $10^1 \sim 10^8$ 分子/反応 |
| プライマー | 200~1000 nM |
| プローブ | 100~1000 nM |
| ヌクレオチド | 各20~200 μ M |
| DNAポリメラーゼ | 0.01~0.03 単位/ μ l |
| Tris-HCl (pH 8.4~9.0) | 5~20mM |
| MgCl ₂ | 1.5~3mM |
| KCl | 10~100mM |
| グリセロール | 0~20% |

(最終液量: 10~100 μ l)

【0047】

また、代表的な温度サイクルを挙げれば、以下の通りであり、この温度サイクルを通常25~40回繰り返す。

- (1) 変性、90~98℃、1~60秒
- (2) アニール、60~70℃、10~60秒

(3) 伸長、60～75℃、10～180秒

【0048】

アニーリング及び伸長を一ステップで行う場合には、60～70℃、10～180秒の条件が挙げられる。

【0049】

本発明定量方法においては、PCRを行いながら検出も行うため、反応終了後増幅産物を取り扱う必要がない。よって、増幅産物による汚染の心配がない。また、PCRを行いながら検出も行うため、検出に必要な時間も大幅に短縮出来る。さらに、増幅に必要な機器と同じ機器で検出するため、容器を移動する必要がない。よって、自動化も容易である。さらに、制限酵素を使用しないため定量性にも優れている。

【0050】

この方法は感度も良く、ヘテロプラスミーの比率が1%以下でも検出可能である。従って、上記定量方法により、mt3243変異を有するDNAを定量し、また、全ミトコンドリアDNAを定量し、それらの定量結果からmt3243変異のヘテロプラスミーの比率を算出することができる。すなわち、本発明は、mt3243変異のヘテロプラスミーの比率の測定方法を提供する。本発明測定方法は、(a) 本発明定量方法により、ミトコンドリアDNA3243変異を有するDNAを定量し、(b) 試料から得られるDNAを鋳型として用いて定量的PCRを行い、増幅産物を定量することを含む、ミトコンドリアDNAの定量方法であって、定量的PCRは、増幅産物の量に依存して蛍光が変化する系を用いて、蛍光の測定によりPCRにおける増幅産物の定量をリアルタイムに行い、その結果に基づいてサンプル中のDNAを定量する方法により、ミトコンドリアDNAを定量し、(c) (a) と (b) の結果から、ミトコンドリアDNA3243変異のヘテロプラスミーの比率を算出することを含むを特徴とする。

【0051】

(b) の工程は、プライマーを、mt3243変異にかかわらずミトコンドリアDNAを増幅できるように設定する他は(a) の工程と同様にして行うことができる。

。

【0052】

(b) の工程におけるPCRに用いるプライマーペアは、通常のPCRにおけるプライマーペアの設定方法と同様にして設定することができる。プライマーの長さ及び T_m は、通常には、12mer～40merで40～70℃、好ましくは16mer～30merで55～60℃である。プライマーペアの各プライマーの長さは同一でなくてもよいが、両プライマーの T_m はほぼ同一であること（通常には、相違が2℃以内）が好ましい。なお、 T_m 値は最近接塩基対法(Nearest Neighbor)により算出した値である。(b) の工程で使用されるプライマーペアは、(a) の工程で使用されるプライマーペアと大部分で重複していることが好ましい。このようにすることによって、プライマーペアの相違の増幅効率に対する影響が少なくなり、正確なヘテロプラスミーの比率を求めることができる。プライマーペアの例としては、配列番号3及び4に示す塩基配列を有するプライマーからなるものが挙げられる。

【0053】

(a) の工程では、変異型ミトコンドリアDNAの定量値、(b) の工程では、全ミトコンドリアDNAの定量値が得られるので、(a) の定量値を(b) の定量値で除算することによりヘテロプラスミーの比率が算出される。(a) 及び(b) の工程の定量結果は(c) の工程で使用されるので、(a) 及び(b) の工程は同時に行ってもよいし、いずれを先に行ってもよい。

【0054】

<3>本発明検出キット

本発明検出キットは、本発明検出方法に用いるためのキットである。このキットは、配列番号1に示す塩基配列の塩基番号243から始まる12～30塩基長の塩基配列に相補的な塩基配列を有するプライマーを含むことを特徴とする。

【0055】

プライマーについては、本発明検出方法に関し、上記に説明した通りである。

【0056】

本発明検出キットにおいてプライマーは、混合物とされていてもよいし、別個に収容されていてもよい。

【0057】

本発明検出キットは、プライマーの他に、P C R および／または増幅産物の検出を行うのに必要とされる試薬類をさらに含んでもよい。

【 0 0 5 8 】

< 4 > 本発明定量キット

本発明定量キットは、本発明定量方法に用いるためのキットである。このキットは、配列番号 1 に示す塩基配列の塩基番号 243 から始まる 12 ～ 30 塩基長の塩基配列に相補的な塩基配列を有するプライマーを含むことを特徴とする。

【 0 0 5 9 】

本発明定量キットは、5' 末端が蛍光色素で標識され、ハイブリダイゼーションしたときに蛍光色素の蛍光が減少する核酸プローブ（消光プローブ）であって、配列番号 1 に示す塩基配列において塩基番号 212 もしくは 215 から始まる 15 ～ 40 塩基長の塩基配列または配列番号 2 に示す塩基配列において塩基番号 222 から始まる 15 ～ 40 塩基長の塩基配列を有する核酸プローブを含むことが好ましい。

【 0 0 6 0 】

プライマーおよび消光プローブについては、本発明の定量方法に関し、上記に説明した通りである。

【 0 0 6 1 】

本発明定量キットは、消光プローブの他に、本発明の定量方法における P C R を行うのに必要とされる試薬類をさらに含んでもよい。本発明の定量キットを、ヘテロプラスミーの比率の測定に用いる場合には、本発明定量キットは、(b) の工程で使用されるプライマーペアは、(a) の工程で使用されるプライマーペアと大部分で重複していることが好ましい。

【 0 0 6 2 】

本発明定量キットにおいて消光プローブ、プライマー及びその他の試薬類は、別個に收容されていてもよいし、それらの一部が混合物とされていてもよい。

【 0 0 6 3 】

【実施例】

以下に、本発明を実施例により具体的に説明する。

【 0 0 6 4 】

【実施例 1】

ヒトミトコンドリア3243A→G変異 (mt3243変異) の部位を含む塩基配列 (配列番号 2、塩基番号243がミトコンドリア遺伝子3243位に相当) に基づき、mt3243変異を含む部分を増幅できるように表 3 に示すプライマーを設計した。表 3 中、位置は、配列番号 2 に示す塩基配列における塩基番号を示す。

【0065】

【表 3】

プライマー

| 名称 | 配列(5'→3') | mer | 位置 | 配列番号 |
|---------|--------------------------|-----|---------|------|
| F-24 | ctcaacttagtattatacccacac | 24 | 187-210 | 3 |
| R-19 | ttttatgcgattaccgggc | 19 | 262-244 | 4 |
| R-mt-16 | atgcgattaccgggcc | 16 | 258-243 | 5 |

【0066】

次に、表 4 に示す、末端部にCを有するプローブを設計した。表 4 中、位置は、配列番号 1 または 2 に示す塩基配列における塩基番号を示す。また、塩基配列中の大文字は、mt3243変異の部位を示し、3'末端の(P)は、リン酸化されていることを示す。BODIPY(商標) FLによる標識は、常法に従って行った。

【0067】

【表 4】

プローブ

| 名称 | 配列(5'→3') | mer | 位置 |
|--------------|--|-----|---------|
| 5FL-mut-5-23 | (BODIPY FL)-cagggtttgttaagatggcagGg-(P) (配列番号 6) | 23 | 222-244 |
| 5FL-1-24 | (BODIPY FL)-ccaagaacagggtttgttaagatg-(P) (配列番号 7) | 24 | 215-238 |
| 5FL-1-26 | (BODIPY FL)-ccaagaacagggtttgttaagatggc-(P) (配列番号 8) | 26 | 215-240 |
| 5FL-1-28 | (BODIPY FL)-ccaagaacagggtttgttaagatggcag-(P) (配列番号 9) | 28 | 215-242 |

5FL-3-30 (BODIPY FL)-cacccaagaacagggtttgttaagatggca-(P) 30 212-241

(配列番号 10)

【0068】

mt3243変異周辺領域を組み込んだプラスミドをサンプルとし、iCycler (Bio-Rad)を用いて、以下の条件でリアルタイムPCRを行った。リアルタイム解析における励起波長及び検出波長は、それぞれ490nm及び530nmであった。

【0069】

【表5】

反応液組成

1. 正常型配列及び変異型配列の両方の定量の系 (全ミトコンドリア数定量の系)

| | |
|------------------------------|----------------|
| H ₂ O | 17.575 μ L |
| 10×Gene Taqバッファー | 2.5 μ L |
| 40% グリセロール | 1.875 μ L |
| 10mM 各dATP, dUTP, dGTP, dCTP | 0.5 μ L |
| 2U/ μ L ウラシル-N-グリコシラーゼ | 0.05 μ L |
| 5 μ M プローブ | 1 μ L |
| 100 μ M プライマー-F-24 | 0.125 μ L |
| 100 μ M プライマー-R-19 | 0.25 μ L |
| 5U/ μ L Gene Taq | 0.125 μ L |
| サンプル | 1 μ L |
| 合計 | 25 μ L |

2. 変異型配列定量の系 (変異を有するミトコンドリアの数の定量の系)

| | |
|------------------------------|----------------|
| H ₂ O | 18.825 μ L |
| 10×Gene Taqバッファー | 2.5 μ L |
| 40% グリセロール | 0.625 μ L |
| 10mM 各dATP, dUTP, dGTP, dCTP | 0.5 μ L |
| 2U/ μ L ウラシル-N-グリコシラーゼ | 0.05 μ L |

| | |
|---------------------------|---------------|
| 5 μ M プローブ | 1 μ L |
| 100 μ M プライマー-F-24 | 0.125 μ L |
| 100 μ M プライマー-R-mt-16 | 0.25 μ L |
| 5U/ μ L Gene Taq | 0.125 μ L |
| サンプル | 1 μ L |
| 合計 | 25 μ L |

【0070】

【表6】

反応条件

50°C, 2min

↓

95°C, 2min

↓

95°C, 10sec

56°C, 30sec (50サイクル)

【0071】

サンプルとして、種々のコピー数で、正常型配列を有するプラスミドを含むサンプルを調製し、プローブとして、プローブ5FL-3-30を用いて、上記1の系で定量を行った。結果を図1に示す。図から明らかなように、定量が可能なが確認された。

【0072】

サンプルとして、種々のコピー数で、変異型配列を有するプラスミドを含むサンプルを調製し、プローブとして、プローブ5FL-3-30を用いて、上記2の系で定量を行った。結果を図2に示す。図から明らかなように、定量が可能なが確認された。

【0073】

サンプルとして、種々の比率で、変異型配列を有するプラスミドと正常型配列を有するプラスミドを含むサンプルとの混合物を調製し、プローブとして、プローブ5FL-3-30を用いて、上記2の系で定量を行った。結果を図3に示す。同じサ

ンプルを上記 1 の系で定量し、変異型配列の比率を算出すると、サンプルの調製時の比率と一致した結果が得られた。

【0074】

プローブとして、プローブ 5FL-1-24、5FL-1-26、5FL-1-28 及び 5FL-mut-5-23 を用いた場合も同様の結果が得られた。

【0075】

なお、図 1～3 において、縦軸は、反応開始時を 100% としたときの蛍光強度、横軸は PCR のサイクル数である。

【0076】

【発明の効果】

本発明によれば、ミトコンドリア DNA 3243 変異を検出および定量する方法ならびにそのためのキットが提供される。

【0077】

【配列表】

<110> アークレイ株式会社 (Arkray, Inc.)

<120> ミトコンドリア DNA 3243 変異の検出法および定量法ならびにそのためのキット

<130> P-B0927

<160> 10

<210> 1

<211> 500

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> allele

<222> 243

<400> 1

```
ggacatcccg atggtgcagc cgctattaaa ggttcgtttg ttcaacgatt aaagtcctac    60
gtgatctgag ttcagaccgg agtaatccag gtcggtttct atctaccttc aaattcctcc    120
ctgtacgaaa ggacaagaga aataaggcct acttcacaaa ggccttccc ccgtaaataga    180
tatcatctca acttagtatt ataccacac ccaccaaga acagggtttg ttaagatggc    240
agagcccggt aatcgcataa aacttaaac ttacagtca gaggttcaat tcctcttctt    300
aacaacatac ccatggccaa cctcctactc ctattgtac ccattctaata cgcaatggca    360
ttcctaatagc ttaccgaacg aaaaattcta ggctatatac aactacgcaa aggccccaac    420
gtggtaggcc cctacgggct actacaacc ttcgctgacg ccataaaact cttcaccaaa    480
gagcccctaa aaccgccac                                     500
```

<210> 2

<211> 500

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> allele

<222> 243

<400> 2

```
ggacatcccg atggtgcagc cgctattaaa ggttcgtttg ttcaacgatt aaagtcctac    60
gtgatctgag ttcagaccgg agtaatccag gtcggtttct atctaccttc aaattcctcc    120
ctgtacgaaa ggacaagaga aataaggcct acttcacaaa ggccttccc ccgtaaataga    180
tatcatctca acttagtatt ataccacac ccaccaaga acagggtttg ttaagatggc    240
agggcccggt aatcgcataa aacttaaac ttacagtca gaggttcaat tcctcttctt    300
```

aacaacatac ccatggccaa cctcctactc ctcattgtac ccattctaata cgcaatggca 360
ttcctaatagc ttaccgaacg aaaaattcta ggctatatac aactacgcaa aggccccaac 420
gtggtaggcc cctacgggct actacaaccc ttcgctgacg ccataaaact cttcaccaaa 480
gagcccctaa aacccgccac 500

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 3

ctcaacttag tattataccc acac 24

<210> 4

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 4

ttttatgcga ttaccgggc 19

<210> 5

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 5

atgcgattac cgggcc

16

<210> 6

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 6

cagggtttgt taagatggca ggg

23

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 7

ccaagaacag ggtttgtaa gatg

24

<210> 8

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 8

ccaagaacag ggtttgtaa gatggc

26

<210> 9

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 9

ccaagaacag ggtttgtaa gatggcag

28

<210> 10

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> probe

<400> 10

caccaagaa cagggtttgt taagatggca

30

【図面の簡単な説明】

【図 1】 実施例 1 の方法（プライマー F-24 及び R-19 使用）による配列全体の定量の結果を示す。

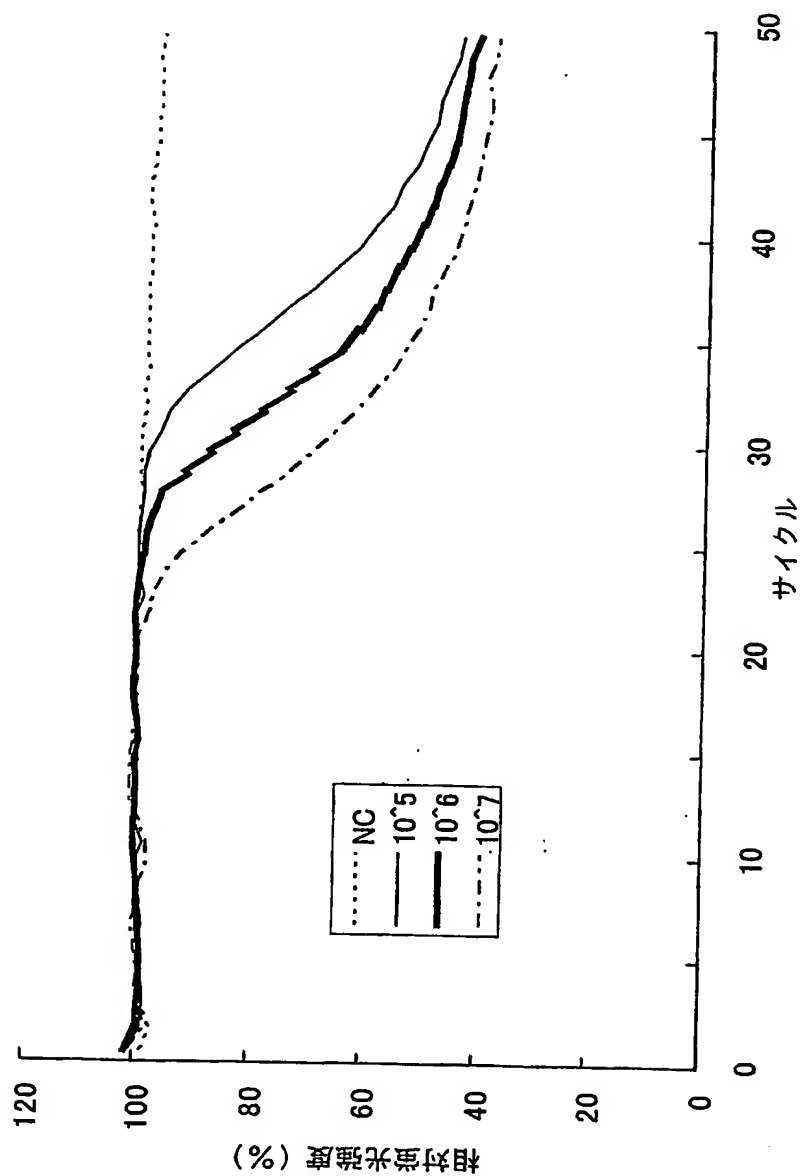
【図 2】 実施例 1 の方法（プライマー F-24 及び R-mt-16 使用）による変異型配列の定量の結果を示す。

【図 3】 実施例 1 の方法（プライマー F-24 及び R-mt-16 使用）による変異遺伝子の割合の異なる試料における定量の結果を示す。

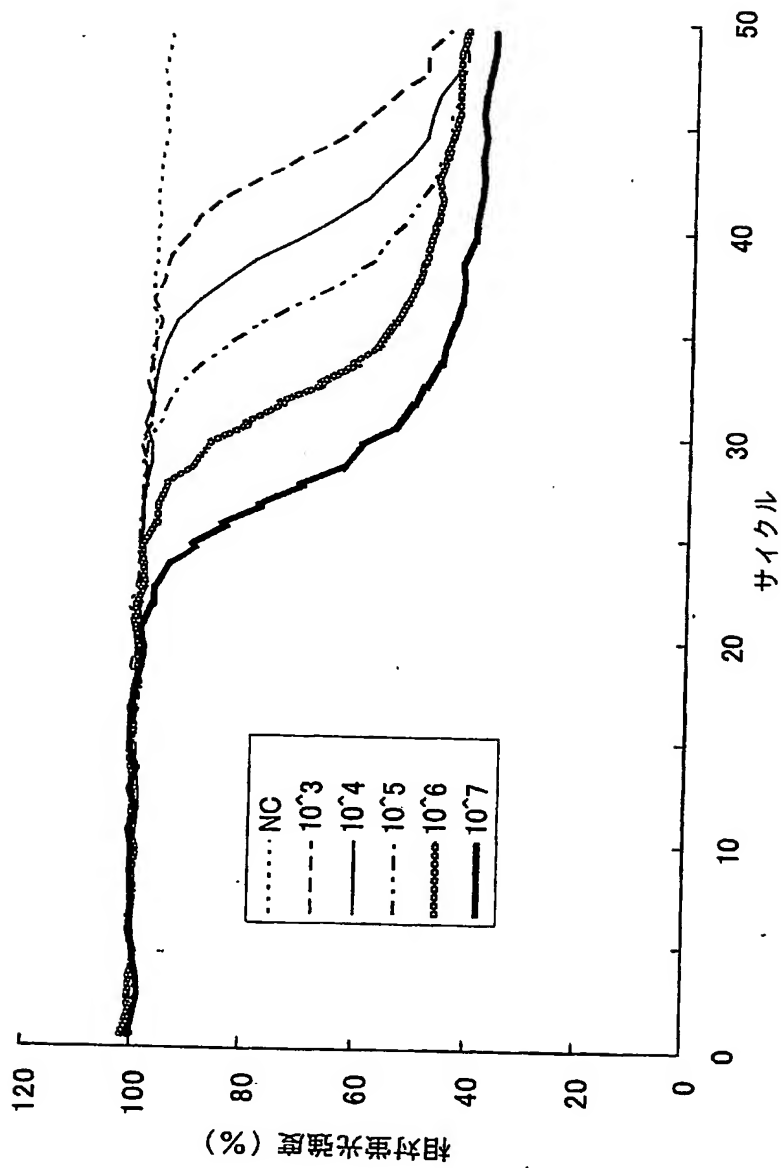
【書類名】

図面

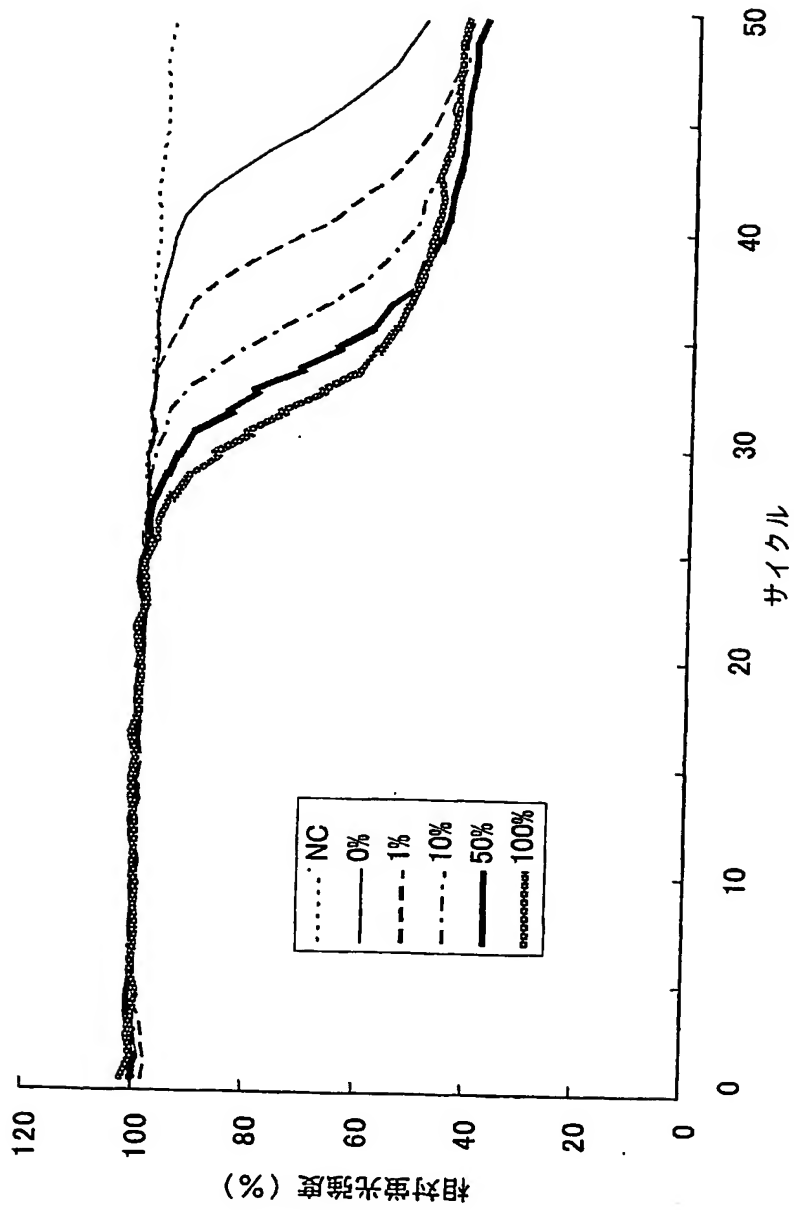
【図 1】



【図 2】



【図3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ミトコンドリアDNA3243変異を検出および定量する方法を提供する。

【解決手段】 試料から得られるDNAを鋳型として用いて定量的PCRを行い、増幅産物を定量することを含む、ミトコンドリアDNA3243変異を有するDNAの定量方法であって、定量的PCRは、増幅産物の量に依存して蛍光が変化する系を用いて、蛍光の測定によりPCRにおける増幅産物の定量をリアルタイムに行い、その結果に基づいてサンプル中のDNAを定量する方法であり、定量的PCRで用いられるプライマーは、配列番号1に示す塩基配列の塩基番号243から始まる12～30塩基長の塩基配列に相補的な塩基配列を有するプライマーを含む。

【選択図】 図2

特願 2 0 0 3 - 1 1 1 1 7 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 1 4 1 8 9 7]

1. 変更年月日

2 0 0 0 年 6 月 1 2 日

[変更理由]

名称変更

住 所

京都府京都市南区東九条西明田町 5 7 番地

氏 名

アークレイ株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.